

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-283345

⑪ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和61年(1986)12月13日
B 01 J 20/26		7106-4G	
C 07 K 3/20		8318-4H	
C 08 F 257/02		6681-4J	
G 01 N 30/48		A-7621-2G	
		Z-7906-2G	
// A 61 K 9/08		6742-4C	
		8214-4C	
C 12 P 21/00		6712-4B	審査請求 未請求 発明の数 4 (全11頁)

⑭ 発明の名称 イムノアフィニティークロマトグラフィー用担体およびその製法

⑮ 特 願 昭60-123512

⑯ 出 願 昭60(1985)6月8日

⑰ 発 明 者 三 原 敏 夫 市原市五井南海岸6番地 電気化学工業株式会社千葉工場内

⑱ 発 明 者 前 田 哲 郎 市原市五井南海岸6番地 電気化学工業株式会社千葉工場内

⑲ 出 願 人 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

⑳ 代 理 人 弁理士 鈴木 定子

明 細 書

1. 発明の名称

イムノアフィニティークロマトグラフィー用担体およびその製法

2. 特許請求の範囲

(1) スチレン及び/又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーとの多孔性スチレン系共重合体を基体とし、該スチレン系共重合体に親水性モノマーがグラフト重合しているイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体。

(2) スチレン及び/又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーとの多孔性スチレン系共重合体に、グラフト活性基を有する化合物を反応させてグラフト活性点を設け、該グラフト活性点に親水性モノマーをグラフト重合させるイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体の製法。

(3) スチレン及び/又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーと、グラフト活性基を有する化合物とを共重合させてグラフト活性点を設け、該グラフト活性点に親水

性モノマーをグラフト重合させるイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体の製法。

(4) スチレン及び/又はその同族体と、

2以上のビニル基を有するモノマーと、

1分子内にビニル基と-O-O-基とを有する化合物とを共重合させて過酸化スチレン系共重合体とし、或いはスチレン及び/又はその同族体と、

2以上のビニル基を有するモノマーと、

グラフト活性基を有する化合物とを共重合させてグラフト活性点を設け、該グラフト活性点に過酸化物を作用させて過酸化スチレン系共重合体とし、該過酸化スチレン系共重合体に親水性モノマーをグラフト重合させるイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体の製法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、多孔性スチレン系共重合体ビーズにアクリルアミドをグラフト重合することにより、高流速のカラム反応に耐えるに充分な強度を有し、しかも不純物の非特異的吸着が極めて少ない、高

速イムノアフィニティークロマトグラフィー用担体の製造に関する。

本発明は、醗酵工業、医薬品工業、化学工業、食品工業等において有用な物質、とりわけバイオテクノロジー分野における生理活性物質、免疫療法剤等の微量有用物質の工業的規模における高純度の精製に利用され、短時間で効率的かつ高純度の精製が可能である。

細胞工学、遺伝子工学における最近の進歩は、有用物質の大量生産手段を提供したが、本発明はこれら有用物質の培養培地からの効率的な精製を工業的規模で可能にするものである。

(従来の技術)

近年のバイオテクノロジーの急速な進歩は、醗酵工業、医薬品工業、化学工業、食品工業などにおいて有用な物質を、遺伝子工学、細胞工学により大量に生産することを可能にした。

これらの有用物質の精製は工業的に重要な技術であり、特に医薬品工業においては、発熱性物質の除去など高純度の精製が要求される。

い特異性を持った単一クローン性抗体を大量に生産することを可能にし、イムノアフィニティークロマトグラフィーを工業的規模で物質の精製に使用することを可能にした。

イムノアフィニティークロマトグラフィーの工業的規模での使用に際し、高流速のカラム反応はきわめて有利である。反応時間の短縮によるプロセスの簡略化、それに伴う発熱性物質など不純物混入の危険性の低下および比較的不安定な物質の精製が可能になる。精製対象物質をカラムから溶出する場合、pH、温度、イオン強度等適当な条件を選択して抗原抗体反応の解離定数の値を大きくするが、アフィニティーが強ければ強い程その条件は厳しくなり、リガンドや精製対象物質を変性させる危険性が増大する。したがって、反応時間の短縮は変性の危険性を低下させ、不安定な物質の精製を可能にする。

アフィニティークロマトグラフィーにおいて従来使用された担体は、アガロース、デキストラン、セルロース、ポリアクリルアミド、多孔性ガラス

分離精製手段は、物理的或いは化学的特性の差を利用した方法と生物学的な親和力を利用した方法に大別されるが、従来工業的規模での精製はほとんど前者のみであった。後者の方法はアフィニティークロマトグラフィーとして知られており、前者に比べ特異性が高く高純度で高収率の精製が可能であるが、リガンド、とりわけ抗体をリガンドとして使用する場合には、その大量入手が困難であるため、工業的規模ではほとんど使用されなかった。

抗原抗体反応は特異性および親和力が特に高いため、リガンドとして抗体を使用するイムノアフィニティークロマトグラフィーは高純度の精製に最適である。

従来、抗体は抗原を動物に免疫し、主にその血液から硫酸塩析、冷エタノール法等により精製して得ていたが、力価および特異性に関し安定した製品が得られず、また大量生産にも限界があった。しかし、1975年にKohlerとMilsteinにより確立された細胞融合法は、どのような物質に対しても高

(多孔性シリカ)、スチレン系共重合体のような合成高分子などであり、親水性のアガロース、ポリアクリルアミドが多く使用され、中でもアガロースは最もよく使用され、アフィニティークロマトグラフィーによる精製例のほとんどがアガロース担体を使用したものである。

アフィニティークロマトグラフィー用担体に要求される条件は、主として下記のものである。

- (1) 親水性であること：水溶性の生体成分或いはそれに関連した物質が精製対象であるため親水性に富んだ担体が望ましい。
- (2) 非特異的吸着性の低いこと：不純物の混入を防ぐため非特異的吸着をなくす必要がある。
- (3) 十分な機械的強度を有すること：カラム方式で高流速の反応を行うためには十分な機械的強度が必要である。
- (4) 多孔性であること：分子量数万或いはそれ以上の巨大分子を取り扱う場合には、それらが障害なく担体の表面及び内部に接近できるよう充分大きな孔径を有することが必要である。イムノアフ

(S)245688S-10 開 発 者
 イニティークロマトグラフィーにおいては、分子
 量約15万もの抗体をリガンドとして使用するため
 この条件は非常に重要である。

(6) リガンド結合のための活性化が容易であるこ
 と：リガンドを結合させるための活性化法が簡単
 でしかも多種類もの活性化法が可能なが望ま
 しい。

理想的な担体とは前述の条件全てを満足する担
 体であるが、従来の担体については(1)から(6)の条
 件を同時に満足するものは皆無であり、特に(1)、
 (2)と(3)の条件は二律背反的である。例えば、アガ
 ロースの場合は、(1)、(2)、(4)、(5)の条件は満足す
 るが、機械的強度が不足し、微生物に汚染されや
 すい。ポリアクリルアミドは、(1)、(2)、(5)の条件
 は満足するが、機械的強度が不足し多孔性度も低
 いため排除限界分子量が小さいという欠点を有す
 る。一方、多孔性ガラスは(3)、(4)、(6)の条件は満
 足するが非特異的吸着性が高く、むしろ水に難溶
 性のリガンドの結合に優れている。しかも多孔性
 ガラスはpH 8 以上では溶解し、孔径が2500 Å 以上

では非常にもろくなるという欠点を有し、種類も
 少なく使用上不便である。

以上述べたように、従来、親水性で非特異的吸
 着性が低く、機械的強度の充分な担体は得られな
 かった。親水性ポリマーにより、このような性能
 を有する担体を製造する試みはなされているが（
 例えばポリビニルアルコール系担体及びポリヒド
 ロキシエチルメタクリレート系担体）、強度を大
 きくするため架橋度を高くしており、前述の条件
 (4)が満足されていない。すなわち排除限界分子
 量の値が小さく、高分子量の物質の精製には使用
 できず、その応用範囲が限られていた。

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明者らは、前述の(1)から(6)の条件を満足
 するイムノアフィニティークロマトグラフィー用担
 体の製造に関し、単一材料系では(1)から(6)の条件
 を満足することは不可能であるため、複合系の担
 体の開発を試みた。すなわち、充分な機械的強度
 を有する基材（疎水性が強く、非特異的吸着性
 が高い）の表面に親水性の材料を結合させ、強度と

親水性（非特異的吸着性が低い）という従来の担
 体では二律背反的であった条件を同時に満足させ
 ようとするものである。

〔問題を解決するための手段〕および〔作用〕

本発明は、充分な多孔性と強度と親水性とを有
 するイムノアフィニティークロマトグラフィー用
 担体及びその製法を提供することを目的とし、そ
 の構成は、多孔性スチレン系共重合体を基体とし、
 該スチレン系共重合体に親水性モノマーをグラフト
 重合させたものである。

すなわち、基体として多孔性スチレン系共重合
 体を使用するものであり、多孔性スチレン系共重
 合体は現在ゲルクロマト用充填剤として使用され
 ており、各社から多くのグレードが販売されてい
 るため入手が容易であり、又使用者が自分で目的
 の性能を有するスチレン系共重合体を製造するこ
 ともできる。又ガラスのように担体の溶解という
 問題がない。

スチレン系共重合体、特にスチレン-ジビニル
 ベンゼン系は硬くて粒子径、粒子径分布、孔径な

どを制御し易く、カラムへの充填が容易であり、
 現在疎水系の充填剤として多用されている。本発
 明者らは、このスチレン系共重合体にグラフト活
 性点を導入し、グラフト重合することにより本発
 明を完成した。

スチレン系共重合体への親水性モノマーの結合
 は、高流速反応、繰返し使用に耐えるに充分な安
 定性を有する必要がある、又そのプロセスは簡便
 であることが望ましい。スチレン系共重合体への
 親水性モノマーのグラフト重合は上記条件を満た
 すプロセスであり、親水性モノマーとしては、ア
 クリルアミド、ヒドロキシエチルメタクリレート、
 ポリビニルアルコールなどがあるが、親水性およ
 びリガンド結合のための活性化法の容易さからア
 クリルアミド及びその誘導体が最適である。又ポ
 リアクリルアミドは生化学の領域で用いられる通
 常の試薬に対し安定であり、酵素微生物の作用も
 受けず、アミド基はpH 2 ~ 10の領域で安定である。

以下、本発明について詳しく述べる。

本発明の担体の基材を構成するスチレン系共重

合体の製造方法は特に制限はなく、乳化重合、懸濁重合、塊状重合、溶液重合の公知技術を任意に適用しうる。

本発明におけるスチレン系共重合体とは、スチレン及び／又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーとの共重合体であり、スチレン及び／又はその同族体とは、スチレン、 α -メチルスチレン、ビニルトルエン、 α -ブチルスチレン、ヒドロキシスチレン、クロロスチレン、シアノスチレン、クロロメチルスチレン、アミノスチレンなどである。

2以上のビニル基を有するモノマーとは、1分子内にエチレン性二重結合を2個以上有する化合物である。例えば、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレート、1,3-ブチレングリコールジメタクリレート、1,4-ブチレングリコールジメタクリレート、プロピレングリコールジメタクリレート、ポリエチレングリコールジメタクリレート、ポリプロピレングリコールジメタクリレート、エチレングリコールジアクリレート、

ポリエチレングリコールジアクリレート、シアン酸トリアル、ネオシアニル酸トリアル、トリメチロールアロバジド、メタクリレート、アクリレート、ビニルメタクリレート、ビニルメタクリレートなどが挙げられ、中でもジビニルベンゼンが特に好ましい。

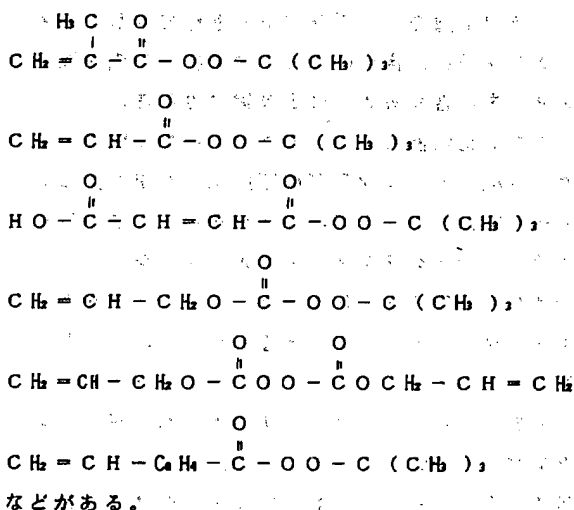
2以上のビニル基を有するモノマーを共重合させると、架橋構造の付与、グラフト活性点の導入の効果が得られる。

更に、本発明の共重合体はスチレン及び／又はその同族体と共重合可能な他のモノマーを共重合させることが可能である。他のモノマーとしては、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等のシアノ化ビニルモノマー、メチルアクリレート、エチルアクリレート、ブチルアクリレート、ヘキシルアクリレート、シクロヘキシルアクリレート、オクチルアクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、グリシジルアクリレート等のアクリル酸エステルモノマー、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、ヒドロ

キシエチルメタクリレート、グリシジルメタクリレート等のメタクリル酸エステルモノマー、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸等の不飽和カルボン酸モノマー、酢酸ビニル、プロパン酸ビニル、ブタン酸ビニル、オクタン酸ビニル、デカノ酸ビニル等の脂肪酸ビニルエステルモノマー、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル、フェニルビニルエーテル等のビニルエーテルモノマー、アクリルアミド、メタクリルアミド等のアミド系モノマー、マレイミド、N-メチルマレイミド、N-エチルマレイミド、N-プロピルマレイミド、N-フェニルマレイミド、N-トリイールマレイミド等のマレイミド系モノマー、塩化ビニル、塩化ビニリデン等のハロゲン化オレフィンモノマーなどが挙げられ、本発明共重合体の50重量%以下の量で使用することが可能である。

更に、本発明のスチレン系共重合体は、グラフト活性点を導入する目的で、エチレン性二重結合と過酸化結合(—O—O—)を同一分子内に有す

るモノマーの共重合を行うことができるが、このようなモノマーを例示すると、



スチレン系共重合体を多孔性とする方法は特に制限はなく、例えば乳化重合で製造したスチレン系共重合体ラテックスに酸や水溶性塩を添加して、スチレン系共重合体のガラス転移温度付近で攪拌する方法、懸濁重合で製造したスチレン系共重合

体ビニズの製造途中或いは製造後にメタン、エタン、プロパン、ベンゼン、メチルエーテル、エチルエーテル、四塩化炭素等の化合物を含浸せしめ、然る後に加熱して多孔質化せしめる方法、スチレン系共重合体溶液を沸騰水中に注加して攪拌する方法などがある。

本発明では、多孔性スチレン系共重合体に親水性モノマーをグラフト重合するが、グラフト重合方法に制限はない。

グラフト重合を効果的に行わしめるためには、スチレン系共重合体の表面あるいは表面付近にグラフト活性点の存在する必要があるが、グラフト活性点は前述した共重合モノマーの共重合により、例えばビニル基、アリル基、クロロメチル基、ヒドロキシ基、エポキシ基、アミノ基、過酸化結合等の官能基として導入することができる。

又、いわゆる高分子反応によりグラフト活性点を導入することも可能であり、例えば、スチレン系共重合体とクロロメチルエーテル ($\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$) とをルイス酸存在下で反

応させて、スチレン系共重合体のベンゼン核にクロロメチル基 ($-\text{CH}_2\text{Cl}$) を導入する方法 (G. D. Jones, Ind. & Eng. Chem., 44, 2686 (1952))、メチラール ($\text{CH}_3(\text{OCH}_2)_2$) を溶媒として塩化スルフルルまたはクロロスルホン酸によりスチレン系共重合体のベンゼン核にクロロメチル基を導入する方法 (Farb. Bayer A-G, Neth. Appl. P., 6414948 (1965))、スチレン系共重合体のビニルトルエン残基のメチル基を塩素化してクロロメチル基を導入する方法等によりクロロメチル化スチレン系共重合体を合成する方法がある。また、スチレン系共重合体を水中に懸濁し、酸存在下で過酸化処理して高分子鎖に $-\text{OOH}$ 基を導入する方法などが可能である。更に、クロロメチル化スチレン系共重合体にチオ尿素を反応させてクロロメチル基をメルカプトメチル基 ($-\text{CH}_2\text{SH}$) に変換する方法も有効である。基質高分子鎖が官能基としてアミノ基を含有する場合には、亜硝酸ナトリウムと反応せしめてジアゾニウムイオン基を導入し、更に硫化水素を反応せしめて、基質

高分子のアミノ基をメルカプト基に変換することができる。

グラフト重合は、グラフト活性点を有しているスチレン系共重合体の存在下で所望する親水性モノマーを重合することにより達成される。

ここで親水性モノマーとは、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸等の不飽和カルボン酸モノマー、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-メチロールアクリルアミド、N, N-ジメチロールアクリルアミド、N-メチロールメタクリルアミド、N, N-ジメチロールメタクリルアミド、N, N'-メチレンビスアクリルアミド、N, N'-メチレンビスメタクリルアミド、N, N'-エチレンビスアクリルアミド、N, N'-エチレンビスメタクリルアミド等のアミド系モノマー、酢酸ビニル、プロパン酸ビニル、ブタン酸ビニル等の脂肪酸ビニルエステルモノマー、N, N-ジメチルアミノエチルアクリレート、N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート

などの(メタ)アクリル酸エステルモノマーなどであるが、アミド系モノマーが特に好ましい。又、脂肪酸ビニルエステルモノマーをスチレン系共重合体にグラフト重合した後に加水分解して、グラフト鎖をポリビニルアルコール鎖に変換すること、も有効である。

グラフト重合操作を例示すると、グラフト活性点を導入した多孔性スチレン系共重合体を、界面活性剤あるいは水溶性高分子物質(例えばポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールブロックコポリマー、カルボキシメチルセルロース、スチレン系共重合体スルホン酸、ポリビニルベンジルトリメチルアンモニウムなど)を用いて水中に分散せしめ、所望するモノマーを添加して懸濁重合する方法、該スチレン系共重合体ビーズを非水溶媒中に分散せしめ、所望するモノマーを添加して懸濁重合する方法などがある。必要に応じて、連鎖移動剤や重合開始剤を添加することができる。連鎖移動剤を例示するならば、オクチルメルカプタン、デシルメルカ

ブタン、ドデシルメルカプタン、チオグリコール酸、チオグリコール酸メチル、チオグリコール酸エチル、チオグリコール酸ブチル、メルカプト安息香酸エチル、1-ナフチルジスルフィド、硫黄、硫黄化合物、四臭化炭素などのハロゲン化合物、リモネン、テルピノレンなどの炭化水素、トリニトロフェノール、トリニトロベンゼン等のニトロ化合物、ベンゾキノンなどがある。また重合開始剤としては、例えば過酸化水素、過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウム、1-ブチルヒドロパーオキシド等の水溶性過酸化化合物、ジベンゾイルパーオキシド、ジクミルパーオキシド、クメンヒドロパーオキシド、1-ブチルパービバレート等の油溶性過酸化化合物等が有効に用いられる。

スチレン系共重合体分子内に過酸化結合を有する場合には、グラフト重合時に還元剤を使用することが好ましく、例えば亜硫酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硫酸第一鉄、リチウムブロマイド等を例示することができる。

グラフト重合により得られた重合物は、一般に

を徐々に加え、58℃で6時間ゆるやかに攪拌しながら反応させた。反応後さらに12時間放置し、クロロメチル化を完結させてからビーズを濾過し、メタノールで3回洗浄した後、減圧下で乾燥させた。

(b) クロロメチル化スチレン系共重合体へのアクリルアミドのグラフト重合

(a)で調製したクロロメチル化スチレン系共重合体20gを20%アクリルアミドモノマー水溶液50ml (N-メチロールアクリルアミド2g、N-N'-メチレンビスアクリルアミド1g、Tween20 0.5% (w/w)を含む)に分散させ、ゆるやかに減圧下24時間攪拌した。次にビーズを濾別し、ロータリーエバポレーター中でゆるやかに回転しながら、50℃、30分減圧下で水を蒸発させた。

n-ヘプタン 100mlにビーズを分散させ、ゆるやかに減圧下5時間攪拌した後、過酸化ベンゾイル2gを添加し、窒素雰囲気下60℃で15時間ゆるやかに攪拌しながら反応させた。

反応後n-ヘプタンで2回、メタノールで3回、

水溶性モノマーの単独重合体を含有している。本発明の目的であるイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体として使用するためには、該単独重合体を除去することが好ましい。精製方法は特に制限はなく、例えば、水、メタノール、エチルエーテル、テトラヒドロフラン等を溶媒としてソックスレー抽出すれば容易に除去される。

リガンドである抗体結合のためのポリアクリルアミドの活性化は、ポリアクリルアミド担体の場合と全く同様の活性化法が応用でき、ヒドラジド、アミノエチル、カルボキシル誘導体等を容易に導入することが可能である。

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

(実施例1)

(a) スチレン系共重合体のクロロメチル化

多孔性スチレン系共重合体ビーズ(東洋曹達工業製、粒子径20~50μ、浸透限界分子量約10⁶)50gをクロロメチルエーテル 200ml中で15時間放置し、十分に膨潤させてから、塩化第二錫15ml

蒸留水で3回洗浄し、減圧下で乾燥させたところ、重量増加率は0.50%であった。ただし、

$$\text{重量増加率} = \left(\frac{\text{グラフト体の重量}}{\text{元の共重合体の重量}} - 1 \right) \times 100(\%)$$

とした。

(c) 非特異的吸着量の測定

(b)で調製したポリアクリルアミドグラフト多孔性スチレン系共重合体ビーズ5mlを1cmφのカラムに充填し、Tween 20を0.5% (w/w) 含む0.02Mホウ酸バッファー(pH8.0、0.15M NaCl含有)で充分緩衝化した。

次に牛血清アルブミン5mgをカラム上部より供給し、0.02Mホウ酸バッファー(pH 8.0、0.15M NaCl含有)を流下させた。カラムからの溶出液のOD_{280nm}が0.01以下になるまで同一バッファーを通液後、0.2Mグリシン-塩酸バッファー(pH2.5)を通液した。このときの牛血清アルブミン回収率を第1表に示した。第1表より、スチレン系共重合体ビーズにポリアクリルアミドをグラフトすることにより、非特異的吸着がほとんど排除され

ていることが判明した。

なお、タンパク質の定量は Lowry の方法により (J. Biol. Chem. 193, 256 (1951))、カラム反応における流速は、50ml/cm・h であった。

第1表

牛血清アルブミン 回収率	ホウ酸バッファ 液溶出画分 (%)	グリシン-塩 酸バッファ 液溶出画分 (%)	合計 %
実施例 1 (c)	98	1	99
比較例 1	0	2	2

(d) ポリアクリルアミドグラフト多孔性スチレン系共重合体ビーズへの抗体の結合

(1) 抗体の調製

抗ウシアルブミン抗体をウサギの抗血清（富士臓器製）より、硫酸塩析および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにより調製した。

(2) ヒドラジド誘導体の調製

する) 50ml に分散し、減圧下 15 時間ゆるやかに攪拌した。次に 5% グルタルアルデヒド 50ml で 30 分間処理し、0.01M PBS (pH 8.0) で充分洗浄した。前記の方法で調製した抗体 100mg を 0.01M PBS (pH 8.0) 50ml に溶解し、グルタルアルデヒドで活性化した上記スチレン系共重合体ビーズと 4℃で一晩反応させた。さらに 0.2 M エタノールアミン (pH 8.5) により室温で 2 時間処理し、未反応のアルデヒド基をブロックした。次に NaB 50mg により、4℃、5 時間の反応でシッフ塩基を還元し、高速イムノアフィニティークロマトグラフィー用吸着体を得た。この場合の抗体結合量は、50mg/g (乾燥重量) であった。

(e) 高速イムノアフィニティークロマトグラフィー用吸着体によるウシ血清中のアルブミンの精製

(d) の (3) の方法で調製した抗ウシアルブミン抗体結合吸着体 5ml を 1cm φ のカラムに充填し、ウシ血清 0.2ml をカラム上部より供給し、0.02M ホウ酸バッファ (pH 8.0、0.15 M NaCl 含有) を溶出液の OD_{280nm} が 0.01 以下になるまで流下させた。

(b) で調製したポリアクリルアミドグラフト多孔性スチレン系共重合体ビーズ 10g を蒸留水 10ml に分散し、減圧下 15 時間ゆるやかに攪拌した。次にあらかじめ 50℃ で 45 分間加熱した 4.5 M 抱水ヒドラジン 20ml を加え、ゆるやかに攪拌しながら、50℃ で 7 時間反応させた。反応終了後、0.1 M NaCl を用いて洗液が 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (TNBS とする) 反応によって青紫色を示さなくなるまで洗浄を行った。

以上の方法により、約 50 μmole/g (乾燥重量) のヒドラジド基が導入された。なお、ヒドラジド基の定量はケルダール法による窒素含量の分析により求めた。(有機定量分析、基礎分析化学講座 11、共立出版) (以下の比較例においても同様である)

(3) 抗体の結合

前述の方法で調製したヒドラジド基導入ポリアクリルアミドグラフト多孔性スチレン系共重合体ビーズ 1g (乾燥重量) を、0.01M リン酸バッファ (pH 8.0、0.15M NaCl 含有) (以下 PBS と

次に 0.2 M グリシン-塩酸バッファ (pH 2.5) を通液して吸着されていたウシアルブミンを溶出した。この結果を第 1 図に示す。カラム反応の流速は 50ml/cm・h であった。なお、この場合の抗原回収率は 41%、精製純度は 98% であった。

精製純度は、グリシン-塩酸バッファ溶出画分を SDS ポリアクリルアミド電気泳動後、クマジーブリリアントブルー染色し、島津二波長クロマトスキャナー CS-910 (島津製作所製) により求めた。また抗原回収率は下記の方法によって測定した。

(1) 抗原の放射性ヨウ素 (¹²⁵I) 標識

クロラミン T 法 (Nature, 194, 495 (1962)) により ¹²⁵I で標識し、ゲル濾過により精製した。

(2) 可溶性抗体の抗原結合量の測定

一定量の抗体溶液に ¹²⁵I 標識した抗原溶液の希釈系列溶液を等量加えてよく攪拌し、一定時間放置後遠心分離し、上清又は沈降物の放射活性を測定し、結合し得る抗原量の最大値を求めた。(抗原濃度、抗体濃度及び放置時間は予備実験により

決定した。)

(3) 吸着体(固定化抗体)の抗原結合量の測定

吸着体をカラムに充填し、 125 Iで標識した抗原を供給してアフィニティクロマトグラフィーを行い、吸着された抗原の放射活性を測定して、吸着体の抗原結合量を求めた。

(4) 抗原回収率の算出

実際のカラム反応において吸着された抗原量(X)と吸着体の作製に使用した可溶性抗体が結合し得る抗原量の最大値(Y)の比率で求めた。すなわち、抗原回収率 = $(X/Y) \times 100(\%)$ とした。

(実施例2)

(a) スチレン系共重合体のクロロメチル化物の製造

ホモジナイザーにスチレン30部、P-クロロメチルスチレン30部、ジビニルベンゼン40部、純水780部、ポリビニルアルコール(重合度2400、ケン化度88%)5.25部、トルエン80部、アゾビスイソブチロニトリル2.5部を仕込み、高速で撹拌した。内容物をステンレス製オートクレーブに移し、

90℃で8時間撹拌して重合を終了した。次いで、オートクレーブを開放し、水蒸気を導入してトルエンと残余のモノマーを除去した。

(b) クロロメチル化共重合体へのアクリルアミドのグラフト重合

(a)で得られたクロロメチル化共重合体20gを実施例1と同様に処理してグラフト重合を実施した。得られたグラフト重合体の重量増加率は、0.54%であった。

(実施例3)

(a) スチレン系共重合体の過酸化物の製造

実施例2で得たクロロメチル化共重合体20部をオートクレーブに仕込み、純水80部、ラウリルトリメチルアンモニウムクロライド0.4部、過硫酸アンモニウム0.4部を加え、内容を酸素で7kg/cm²Gに加圧した。次いで内容物を80℃で1時間、更に100℃で10分間撹拌した。冷却後、スチレン系共重合体を冷水で水洗して、ポリマー表面に付着した過硫酸アンモニウムを除去した。

(b) スチレン系共重合体過酸化物へのアクリルア

ミドのグラフト重合

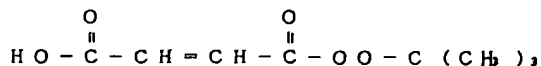
(a)で得られたスチレン系共重合体の過酸化物30部を純水100部、アクリルアミド20部、N-メチロールアクリルアミド10部、ポリエチレンオキサイド-ポリプロピレンオキサイドブロックコポリマー(ポリプロピレンオキサイドの分子量2350、総分子中のエチレンオキサイド42%)0.25部と共にオートクレーブに仕込み、内容を充分窒素置換した後、4%亜硝酸ナトリウム水溶液50部を連続添加しつつ、50℃で7時間撹拌した。

グラフト重合体を分離し、メタノールでソックスレー抽出した。精製したグラフト重合体の重量増加率は32.7%であった。

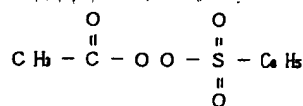
(実施例4)

(a) スチレン系共重合体の過酸化物の製造

ホモジナイザーにスチレン50部、ジビニルベンゼン50部、純水780部、トルエン80部、ポリビニルアルコール5.25部、



8部、



0.2部を仕込み、2℃で高速撹拌した。次いで内容をオートクレーブに移し、45℃で6時間加熱して重合を終了した。次いでオートクレーブを開放して、水蒸気を導入し、トルエンと残余のモノマーを除去した。

(b) スチレン系共重合体の過酸化物のグラフト重合

(a)で得られたスチレン系共重合体の過酸化物を実施例3と同様に処理してグラフト重合体を得た。精製したグラフト重合体の重量増加率は8.75%であった。

(実施例5)

(a) スチレン系共重合体のメルカプトメチル化物の製造

実施例2の(a)で得たクロロメチル化共重合体20部を、80部の乾燥ヘキサン中に添加し、窒素雰囲気

気下で三硫化砒素のエーテル溶液を5部添加した。次いで、チオ尿素を10部添加して3時間窒素雰囲気下で還流した。

ポリマーを濾過し、水中に添加し、NaOHでpH12とし、70℃で30分攪拌した。

ポリマーを水洗し、スチレン系共重合体のメルカプトメチル化物を得た。

(b) スチレン系共重合体のメルカプトメチル化物のグラフト重合

(a)で得られたメルカプトメチル化共重合体を実施例1の(b)と同様に処理してグラフト重合を実施した。得られたグラフト重合体の重量増加率は3.44%であった。

(比較例1)

実施例1の(a)で原料として使用した未グラフト処理多孔性スチレン系共重合体ビーズを、実施例1の(c)と同様に処理し、非特異的吸着量を測定し、その結果を第1表に併記した。

(比較例2)

バイオゲルP-300(バイオラッド社)1gをシ

リコンで処理したフラスコに入れ、蒸留水40mlを加えて15時間放置し膨潤させた。次に50℃で45分加熱した6M抱水ヒドラジン40mlを加え、攪拌下50℃で1時間反応させた。反応終了後、0.1M NaClで、洗液がTNBS反応によって青紫色を示さなくなるまで洗浄を行った。以上の方法によって約200μmole/g(乾燥重量)のヒドラジド誘導体が得られた。

(比較例3)

比較例2で調製したヒドラジド基導入バイオゲルP-300 0.5g(乾燥重量)を0.01M PBS(pH8.0)中で充分膨潤させた後、5%グルタルアルデヒド50mlで30分間処理し、0.01M PBS(pH8.0)で充分洗浄した。次に実施例1の(d)の(i)で調製した抗体100mgを0.01M PBS(pH8.0)50mlに溶解し、グルタルアルデヒドで活性化した上記担体と4℃で一晩反応させた。さらに0.2Mエタノールアミン(pH8.5)で室温2時間の処理を行い、未反応のアルデヒド基をブロックした。次にNaBH₄ 50mgと、4℃、5時間反応させシッフ塩基を還元

した。抗体結合量は35mg/g(乾燥重量)であった。

(比較例4)

比較例3で調製した吸着体を1cmφのカラムに充填し、流速が5ml/cm²・hである以外は、実施例1の(a)と全く同様の方法により、ウシ血清中のアルブミンを精製した。抗原回収率は5%、精製純度は99%であった。なお、カラム流速は上記の値より大きくするとカラムの目詰まりを起し、高流速での反応は不可能であった。この結果を第2図に示した。

(発明の効果)

かくの如く、本発明により高流速のカラム反応に耐えるに十分な強度を有し、しかも非特異的吸着の極めて少ない高速イムノアフィニティークロマトグラフィー用担体が得られ、工業的規模での実施が可能になった。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例1の(a)における、第2図は比較例4における、ウシアルブミンの溶出量

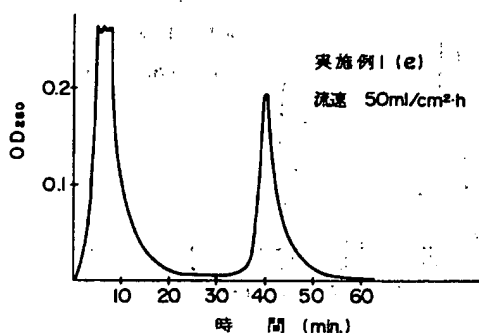
とカラム通液時間との関係をそれぞれ示す。

特許出願人 電気化学工業株式会社

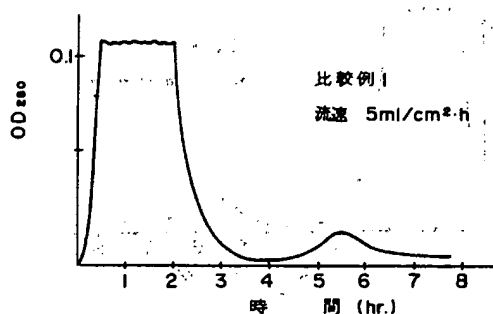
代理人 弁理士 鈴木 定子

手続補正書
昭和60年7月5日

第1図



第2図



特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示
昭和60年特許願第123512号
2. 発明の名称
イムノアフィニティークロマトグラフィー用担体
およびその製法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
住所 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号
名称 (329) 電気化学工業株式会社
代表者 篠原 晃
4. 代理人 ㊟150
住所 東京都渋谷区桜丘町29番31号
清桜ハイツ 601号
氏名 7804 弁理士 鈴木 定子
電話 03-463-5046 番
5. 拒絶理由通知の日付 自発
6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲、
発明の詳細な説明の欄及び図面

7. 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。
- (2) 明細書第19頁、4行目から5行目の「硫黄、硫黄化合物」を「硫黄等の硫黄化合物」に訂正する。
- (3) 図面を別紙の通り訂正する。

以上

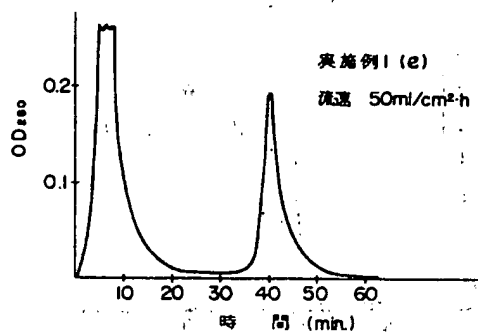
訂正特許請求の範囲

- (1) スチレン及び／又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーとの多孔性スチレン系共重合体を基体とし、該スチレン系共重合体に親水性モノマーがグラフト重合しているイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体。
- (2) スチレン及び／又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーとの多孔性スチレン系共重合体に、グラフト活性基を有する化合物を反応させてグラフト活性点を設け、該グラフト活性点に親水性モノマーをグラフト重合させるイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体の製法
- (3) スチレン及び／又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーと、グラフト活性基を有する化合物とを共重合させてグラフト活性点を設け、該グラフト活性点に親水性モノマーをグラフト重合させるイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体の製法。

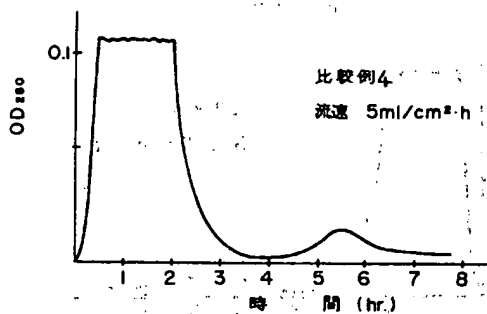
- (4) スチレン及び／又はその同族体と、
2以上のビニル基を有するモノマーと、

1分子内にビニル基と-O-O-基とを有する化合物とを共重合させて過酸化スチレン系共重合体とし、或いはスチレン及び／又はその同族体と、2以上のビニル基を有するモノマーと、更に必要に応じてグラフト活性基を有する化合物との共重合体に過酸化物を作用させて過酸化スチレン系共重合体とし、該過酸化スチレン系共重合体に親水性モノマーをグラフト重合させるイムノアフィニティークロマトグラフィー用担体の製法。

第1図



第2図



1. The first part of the document is a cover sheet which contains the title of the invention, the name of the inventor, and the name of the assignor. It also contains a brief summary of the invention and a statement of the inventor's belief that the invention is new and useful.

2. The second part of the document is a description of the invention. This part contains a detailed description of the invention, including a description of the structure and operation of the invention. It also contains a description of the advantages of the invention over the prior art.

3. The third part of the document is a set of claims. These claims define the scope of the invention and are the legal basis for the patent. They are written in a specific, concise, and definite manner.

4. The fourth part of the document is a set of drawings. These drawings illustrate the invention and are used to help the examiner understand the invention. They are usually accompanied by a legend or a key.

5. The fifth part of the document is a set of references. These references are citations to other patents or publications that are relevant to the invention. They are used to show the state of the art and to support the inventor's claims.

6. The sixth part of the document is a set of notes. These notes are written by the inventor and contain additional information about the invention. They are usually written in a more informal manner than the other parts of the document.

7. The seventh part of the document is a set of exhibits. These exhibits are physical objects or documents that are related to the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.

8. The eighth part of the document is a set of affidavits. These affidavits are sworn statements by the inventor or other persons who are involved in the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.

9. The ninth part of the document is a set of declarations. These declarations are statements by the inventor or other persons who are involved in the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.

10. The tenth part of the document is a set of conclusions. These conclusions are the final statements of the inventor or other persons who are involved in the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. The first part of the document is a cover sheet which contains the title of the invention, the name of the inventor, and the name of the assignor. It also contains a brief summary of the invention and a statement of the inventor's belief that the invention is new and useful.

2. The second part of the document is a description of the invention. This part contains a detailed description of the invention, including a description of the structure and operation of the invention. It also contains a description of the advantages of the invention over the prior art.

3. The third part of the document is a set of claims. These claims define the scope of the invention and are the legal basis for the patent. They are written in a specific, concise, and definite manner.

4. The fourth part of the document is a set of drawings. These drawings illustrate the invention and are used to help the examiner understand the invention. They are usually accompanied by a legend or a key.

5. The fifth part of the document is a set of references. These references are citations to other patents or publications that are relevant to the invention. They are used to show the state of the art and to support the inventor's claims.

6. The sixth part of the document is a set of notes. These notes are written by the inventor and contain additional information about the invention. They are usually written in a more informal manner than the other parts of the document.

7. The seventh part of the document is a set of exhibits. These exhibits are physical objects or documents that are related to the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.

8. The eighth part of the document is a set of affidavits. These affidavits are sworn statements by the inventor or other persons who are involved in the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.

9. The ninth part of the document is a set of declarations. These declarations are statements by the inventor or other persons who are involved in the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.

10. The tenth part of the document is a set of conclusions. These conclusions are the final statements of the inventor or other persons who are involved in the invention. They are used to provide evidence for the inventor's claims.